

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0619-04

•临床研究•

冠心病患者对氧磷酶基因多态性分析

邵海琴¹, 张英²

(1. 河北工程学院医学院检验系, 河北省邯郸市 056002; 2. 武汉市第一医院肿瘤科, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 内科学; 对氧磷酶; 启动子; 动脉粥样硬化; 冠心病; 基因型; 等位基因频率

[摘要] 目的 探讨中国人对氧磷酶基因-162A/G、-909C/G 遗传多态性与冠心病的关系。方法 应用聚合酶链反应对冠心病患者和正常对照者对氧磷酶 1 基因酶切位点的限制性片段长度多态性进行分析。结果 对氧磷酶 1-162A/G 多态性位点在正常对照组中 AA、AG、GG 基因型频率及 A、G 等位基因频率分别为 0.047、0.203、0.750 和 0.148、0.852, 冠心病组与对照组基因型分布总体构成比差异无显著性 ($P > 0.05$), 冠心病组与对照组等位基因频率分布差异也无显著性 ($P > 0.05$)。对氧磷酶 1-909C/G 多态性位点在正常对照组中 CC、CG、GG 基因型频率及 C、G 等位基因频率分别为 0.258、0.523、0.219 和 0.520、0.480, 冠心病组与对照组基因型频率和等位基因频率差异未见显著性 ($P > 0.05$)。冠心病不随两个多态性位点危险基因型个数的增加而发病率呈上升趋势 ($P > 0.05$)。结论 未发现对氧磷酶 1-162A/G 和对氧磷酶 1-909C/G 基因多态性与中国人群冠心病相关联, 对氧磷酶 1-162A/G 和对氧磷酶 1-909C/G 基因多态性对冠心病的影响无协同性。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The Paraoxonase1-162A/G, -909C/G Polymorphism in Patients with Coronary Heart Disease in Chinese Population

SHAO Hai-Qin, and ZHANG Ying

(Department of Laboratory, Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056002, China)

[KEY WORDS] Paraoxonase; Atherosclerosis; Coronary Heart Disease; Polymorphism; Hazardous Genotype; Cooperative Effect

[ABSTRACT] **Aim** To study the association between the polymorphism in the promoter region in human paraoxonase (PON1) gene and coronary heart disease (CHD) in Chinese population. **Methods** The genotype and allele frequency of paraoxonase 1 gene polymorphism were assayed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Results** The frequencies of PON1-162A/G genotype and allele in control were 0.047, 0.203, 0.750 and 0.148, 0.852, respectively. There was no significant difference in genotype and allele frequency between control and CHD group.

The frequencies of PON1-909C/G genotype and allele in control were 0.258, 0.523, 0.219 and 0.520, 0.480, respectively. There was no significant difference in genotype and allele frequency between control and CHD group. Increasing number of hazardous genotype of PON1 was not associated with CHD.

Conclusions These results suggested that PON1-162A/G, PON1-909C/G gene polymorphism were not associated with CHD in Chinese population. There was no cooperative effect among these hazardous genotype with CHD.

已证明, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 与低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 处于同一氧化环境时, 生成脂质过氧化物的量少于二者单独生成的过氧化物的总量; HDL 上脂质过氧化物的聚集量与 LDL 存在与否无关, 但在 HDL 存在的情况下, LDL 上脂质过氧化物的聚集量减少。Mackness 等^[1]发现, 纯化的人 HDL 结合的对氧磷酶 1 (paraoxonase, PON1) 能通过水解脂过氧化物, 防止 LDL 中脂过氧化物产生和积聚来阻碍 LDL 的氧化

修饰, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的预防中发挥重要作用, 因此 PON1 酶活性及其基因多态性与 As 关系的研究越来越受到重视。本文对 PON1 启动子-162A/G 和-909C/G 多态性分布频率与冠心病 (coronary heart disease, CHD) 的关系进行了探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象

冠心病组 86 例, 男 49 例, 女 37 例, 平均 62 ± 8 岁 (40~70 岁), 依据国际心脏病学会和协会及 WHO 临床命名标准化联合专题组报告制定的《缺血性心脏病的命名和诊断标准》诊断, 经冠状动脉造影或有临床指标由武汉大学中南医院和华中科技大学附属

[收稿日期] 2004-11-01 [修回日期] 2005-09-10

[作者简介] 邵海琴, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子生物学诊断, 联系电话为 0310-5228747, E-mail 为 shaomm@inhe.net。张英, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病的介入治疗, 联系电话为 0310-5228747, E-mail 为 shaomm@inhe.net。

协和医院确诊。经冠状动脉造影确诊 62 例, 由临床指标确诊 24 例。对照组 128 例, 男 83 例, 女 45 例, 平均 62 ± 7 岁(40~70 岁), 为无血缘关系的健康个体, 除外以下疾病: 肝脏疾病、高血压、心血管病史、肿瘤及内分泌疾病。

1.2 主要仪器和试剂

DNA 扩增仪 (PE2400), Taq 酶 (Promega), pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen), BstU iv 限制性内切酶 (NEB), BsmA iv 限制性内切酶 (NEB), Lambda DNA/EcoR iv+ Hind ④Marker (Promega), pBR322 DNA/Hae ④Marker (华美生物工程公司)。

1.3 基因多态性分析

对氧磷酶 1-162A/G 引物序列为 Primer F: 5'-GCT ATT CTT CAG CAG AGG GT -3', Primer R: 5'-TGA ATC TGT AGC CAG GGC AC -3'。对氧磷酶 1-909C/G 引物序列为 Primer F: 5'-AAC ATG TCA CTG TGG CAT ATA TAA TGC TC-3', Primer R: 5'-CAT TCA CAG TAA CAG CAG ACA GCA GAG AAA AGA-3'。模板 DNA 用改良碘化钠法从外周血 (EDTA-K₂ 抗凝) 白细胞中提取, 进行聚合酶链反应扩增。PON1-162A/G 扩增产物经 BstU iv 酶切消化后, 1% 琼脂糖凝胶板中电泳。PON1-909C/G 扩增产物经 BsmA iv 酶切消化后, 进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染后分析结果。

1.4 血脂分析

禁食 12 h, 次日清晨静脉采血分离血浆, 利用酶法测定总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG), 选择性遮蔽法直接测定高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), 直接法测定低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC), 双波长免疫透射比浊法测定载脂蛋白 A iv。TC 和 TG 测定试剂由法国申能公司提供, HDLC、LDLC 和载脂蛋白 A iv 测定试剂由日本第一化学药品株式会社提供。

1.5 统计学处理

研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、基因型频率和等位基因频率差异的比较用 χ^2 检验, 不同基因型亚组血脂水平比较采用协方差分析, 各多态性位点发生冠心病的危险度估计采用 Logistic 回归分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 对氧磷酶 1-162A/G 和-909C/G 位点的多态性

从图 1 (Figure 1) 可见, PON1-162A/G 位点出现 3

种基因型, 分别为 AA、AG 和 GG。聚合酶链反应产物片段大小为 1 210 bp, 根据该位点是否存在内切酶识别位点 (CG'CG), 3 种基因型个体分别产生 1 条、3 条和 2 条电泳带。

聚合酶链反应产物经 BsmA iv 限制性内切酶消化后, 电泳结果发现 PON1-909C/G 位点出现 3 种基因型, 分别为 CC、CG、GG。聚合酶链反应产物片段大小为 256 bp, 根据该位点是否存在内切酶识别位点 [GTCTC(1/5)], 三种基因型个体分别产生 1 条、3 条和 2 条电泳带 (图 2, Figure 2)。

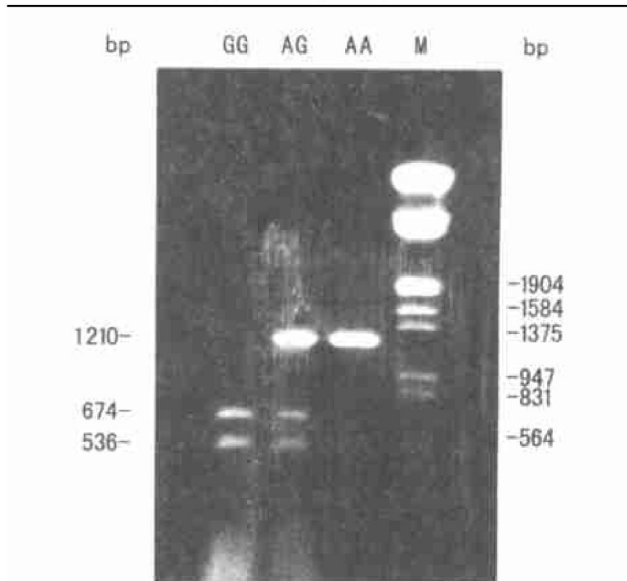


图 1. 对氧磷酶 1-162A/G 位点聚合酶链反应图谱

Figure 1. PCR-RFLP result of human PON1-162A/G

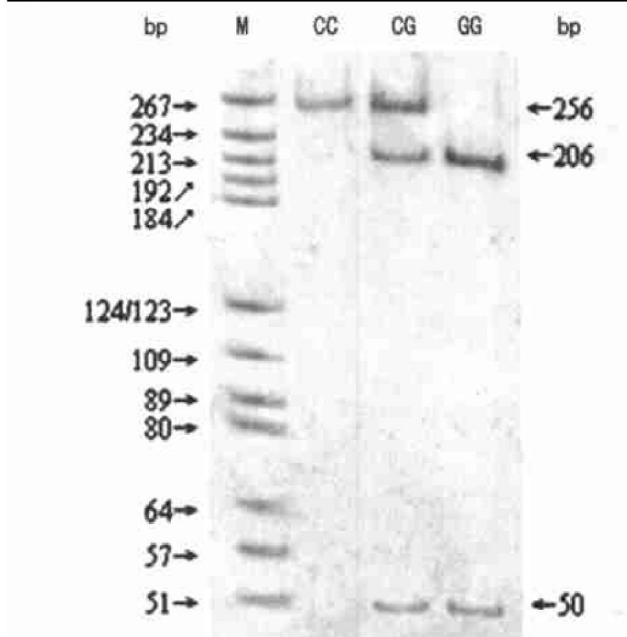


图 2. 对氧磷酶 1-909C/G 位点聚合酶链反应图谱

Figure 2. PCR-RFLP result of human PON1-909C/G

2.2 冠心病组与对照组血脂水平的比较

由表 1(Table 1) 可见, 冠心病组血浆 HDLC 和载脂蛋白 A iv 水平较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$), 血浆 TC、TG 和 LDLC 水平在冠心病组和正常对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1. 冠心病组与对照组血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of serum lipid levels between CHD group and control group

指 标	对照组 ($n = 128$)	冠心病组 ($n = 86$)
TC (mmol/L)	4.318 \pm 0.472	4.351 \pm 0.506
TG (mmol/L)	1.252 \pm 0.832	1.373 \pm 0.795
HDLC (mmol/L)	1.237 \pm 0.453	1.077 \pm 0.549 ^a
LDLC (mmol/L)	2.375 \pm 0.186	2.413 \pm 0.252
ApoA iv (g/L)	1.211 \pm 0.255	1.119 \pm 0.326 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 中国人与不同种族人群对氧磷酶基因多态性的比较

由表 2(Table 2) 可见, 中国人 PON1-162 A/G 位点 A 和 G 等位基因频率分别为 0.124 和 0.876, 与美国白种人^[2]同一等位基因频率相比差异有显著性 ($\chi^2 = 21.18, P < 0.05$); 与日本人^[3]同一等位基因频率相比, 无统计学差异 ($\chi^2 = 0.64, P > 0.05$)。

表 2. 不同种族人群对氧磷酶 1-162 A/G 基因型及等位基因频率的比较

Table 2. Genotype and allele frequency of PON1-162 A/G polymorphism in Chinese (this study) and other population

人种	n	基因型			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
中国人	214	0.042	0.164	0.794	0.124	0.876
美国白种人	376	0.048	0.372	0.580	0.234	0.766
日本人	132				0.100	0.900

由表 3(Table 3) 可见, 在 PON1-909C/G 位点, 中国人 C、G 等位基因频率分别为 0.516 和 0.484, 与美国白种人^[2]、北爱尔兰人和苏格兰人^[3]的同一等位基因频率相比, 差异无显著性。与法国人^[4]相比, 则差异存在显著性 ($\chi^2 = 5.031, P < 0.05$)。

2.4 两组间对氧磷酶 1-162A/G、-909C/G 多态性比较及其与发生冠心病危险度的相关性

冠心病组和对照组的基因型均分布符合 Hardy-Weinberg 平衡原理, 具有群体代表性。冠心病组和

对照组间 PON1-162A/G 基因型频率和等位基因频率未见显著性差异 ($P > 0.05$)。三种基因型中 GG 基因型有发生冠心病的危险趋势, 但其危险度的 OR 值没有统计学意义 ($OR = 1.542, P = 0.550$)。两组间 PON1-909C/G 基因型频率和等位基因频率未见显著性差异 ($P > 0.05$); 三种基因型中 GG 基因型有发生冠心病的危险趋势, 但其危险度的 OR 值没有统计学意义 ($OR = 1.061, P = 0.887$)。

表 3. 不同种族人群对氧磷酶 1-909C/G 基因型及等位基因频率的比较

Table 3. Genotype and allele frequency of PON1-909C/G polymorphism in Chinese (this study) and other population

人种	n	基因型			等位基因频率	
		CC	CG	GG	C	G
中国人	214	0.248	0.537	0.215	0.516	0.484
美国白种人	376	0.287	0.503	0.210	0.539	0.461
北爱尔兰人	824	0.269	0.502	0.228	0.521	0.479
苏格兰人	725	0.277	0.509	0.214	0.532	0.468
法国人	355	0.327	0.515	0.158	0.585	0.415

把 PON1 基因启动子区-162A/G、-909C/G 两个多态性位点与冠心病的危险性作联合分析, 把两个多态性位点基因型进行有意义组合, 结果发现, 有 1 个危险基因型个体的 $OR = 1.667, P = 0.234$; 有 2 个危险基因型个体的 $OR = 1.111, P = 0.222$, 均无统计学意义, 说明 PON1 启动子-162A/G、-909C/G 两个多态性位点对冠心病的影响无协同性。PON1-162A/G、-909C/G 多态性位点不同基因型亚组之间血脂水平也没有明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

血清 LDL 氧化是 As 发生发展的一个重要的早期环节。目前认为, 当 LDL 被氧化修饰后形成氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL) 后, 极易被巨噬细胞吞噬继而形成泡沫细胞。在一定条件下, ox-LDL 被巨噬细胞清道夫受体 (SR-A, CD36) 高速率摄取, 导致泡沫细胞形成^[5,6]。沉积的 ox-LDL 可以改变内皮细胞表面分子, 导致内皮通透性增加和内皮功能受损, 使 LDL 向动脉内膜下的迁移进一步增加。此外, ox-LDL 还促使内皮细胞产生白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 并促进血管细胞表面粘附分子 1 (VCAM-1) 大量产生, 而使血流中的单核细胞与内皮细胞粘附并大量进入内皮下, 摄取脂质并转化

为巨噬细胞,后者进一步摄入脂质而转化为泡沫细胞,动脉粥样斑块进一步发展增大^[7]。PON1 通过破坏氧化的磷脂,削弱了 ox-LDL 减少血管壁单核细胞结合与转运以及诱导炎症产生的能力。对 PON1 抗氧化、抗炎功能的证据还来源于 PON1 敲除小鼠^[8]。PON1 敲除小鼠中分离的 HDL 和 LDL 比野生型小鼠的脂蛋白对氧化更敏感,获得的 HDL 组分与野生型小鼠的 HDL 相比缺乏保护功能,说明 PON1 是 HDL 发挥抗 LDL 氧化功能的主要成分。

对 PON1 启动子区-162A/G、-909C/G 多态性位点的研究显示,其基因型频率及等位基因频率分布在两组间差异无显著性($P > 0.05$),162A/G 和 909C/G 位点各基因型亚组间血脂水平亦无显著性差异($P > 0.05$),表明 PON1 启动子区-162A/G 和-909C/G 多态性位点与中国人冠心病可能无关联。已证实在 PON1 编码区存在 Q192R 和 L55M 两个多态性位点。一些研究表明 192 多态性与冠心病危险性相关,RR 可能增加冠心病的风险率^[9],而 RR 基因型中 PON1 活性比 QQ 基因型高,血清 PON1 浓度与密码子 55L/M 多态性相关,却与 192Q/R 无关^[10]。现在又发现在 PON1 上游启动子区存在 T-108C、A-162G 和 G-909C 3 个多态性位点,并且有资料显示 T-108C、A-162G 和 G-909C 多态性能影响 PON1 的活性水平^[11]。也有资料只证实 T-108C 基因多态性能影响 PON1 的转录和浓度^[12]。Ilia Leviev 等^[13]报道 T-108C 基因多态性为冠心病的一个独立危险因子。是否 108C/T 多态性是一个功能性位点,通过调节 PON1 表达以影响该酶活性和浓度,而 162A/G、909C/G 通过与其连锁来调节血清对氧磷酶浓度,还有待进一步研究。

对 PON1 启动子基因 162A/G、909C/G 多态性位点各基因型发生冠心病的危险度分析显示,162GG 基因型和 909GG 基因型有发生冠心病的危险趋势,但其危险度的 OR 值均无统计学意义(前者 OR=1.542, $P=0.550$; 后者 OR=1.061, $P=0.887$)。我们把 162GG 基因型、909GG 基因型当作可能的危险因子,分析其与冠心病的关系,结果发现,有 1 个危险基因型的个体 OR=1.667, $P=0.234$; 有 2 个危险基因型的个体 OR=1.111, $P=0.834$,其发病危险性的 OR 值均无统计学意义($P > 0.05$),说明冠心病并不随危险基因型个数的增加而发病率呈上升趋势,也就是说, PON1 启动子基因-162A/G、-909C/G

多态性对于冠心病的发生无协同性。

把中国汉族人群 PON1 启动子基因-162A/G、-909C/G 多态性研究结果与其他种族研究结果的比较显示,在 PON1-162A/G 多态性位点,中国人 G 等位基因频率为 0.876,显著高于美国白种人的 0.766 ($P < 0.05$),而与日本人的 0.900 相比则无明显差异 ($P > 0.05$)。在 PON1-909C/G 多态性位点,中国人 G 等位基因频率为 0.484,明显高于法国人 G 等位基因频率(0.415),与美国白种人(0.461)、北爱尔兰人(0.479)和苏格兰人(0.468)的同一等位基因频率相比没有显著性差异($P > 0.05$)。分析这些结果的差异,可能与研究对象的种族差异、地区差异和饮食环境等不同有关,同时提示我们应进行大样本的研究分析,以期得到更详细、准确的结果。

[参考文献]

- [1] Mackness MI. Commentary A-esterases: enzymes looking for a role? *Biochem Pharmacol*, 1989, **38** (9): 385-390
- [2] Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, Karam WG. Effects of 5' regulatory region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001, **68** (12): 1428-436
- [3] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, Stroup D. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 1996, **33** (4): 498-509
- [4] Leviev I, Poirier O, Nicaud V, Wang DP, Miller WF. High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (5): 463-467
- [5] Chiang JYL, Yang TP, Wang DP. Cloning and 5'-Flanking Sequence of a Rat Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **132** (3): 337-339
- [6] Crestani M, Galli G. Genomic cloning, sequencing and analysis of the hamster cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7). *Arch Biochem Biophys*, 2004, **306** (3): 451-460
- [7] Wang DP. Structure and Nucleotide Sequences of the Human Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene. *Genomics*, 2004, **20** (2): 320-323
- [8] Shih DM, Gu L, Xia YR, Crestani M. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 1998, **394** (2): 284-287
- [9] Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*, 1995, **96** (11): 3005-008
- [10] Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest*, 1997, **99** (1): 62-65
- [11] Victoria HB, Rachel LJ, James BC, Miller CS. Effects of 5' regulatory region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001, **68** (7): 1428-436
- [12] Victoria HB, Michele DH, James BC, Mackness B, Mackness MI, Arrol S, et al. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*, 2001, **11** (1): 77-84
- [13] Ilia L, Alberto R, Richard WJ, Haley RW, Billecke S, La Du BN, et al. Paraoxonase promoter polymorphisms T(-107) C and relative paraoxonase deficiency as determinants of risk of coronary heart disease. *J Mol Med*, 2001, **79** (3): 457-463

(此文编辑 朱雯霞)